

DERWENT-ACC-NO: 1992-392238  
DERWENT-WEEK: 200051  
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: New ACE inhibiting peptide for hypertension treatment and health foods  
- contain peptide obtd. by trypsin decomposing whey protein

PATENT-ASSIGNEE: CALPIS SHOKUHN KOGYO KK[CALV]

PRIORITY-DATA: 1991JP-0046431 (March 12, 1991)

| PATENT-FAMILY: | PUB-DATE           | LANGUAGE | PAGES | MAIN-IPC    |
|----------------|--------------------|----------|-------|-------------|
| PUB-NO         |                    |          |       |             |
| JP 3091772 B2  | September 25, 2000 | N/A      | 005   | C07K 014/46 |
| JP 04282400 A  | October 7, 1992    | N/A      | 005   | C07K 015/06 |

| APPLICATION-DATA: | APPL-DESCRIPTOR | APPL-NO        | APPL-DATE      |
|-------------------|-----------------|----------------|----------------|
| PUB-NO            |                 |                |                |
| JP 3091772B2      | N/A             | 1991JP-0046431 | March 12, 1991 |
| JP 3091772B2      | Previous Publ.  | JP 4282400     | N/A            |
| JP 04282400A      | N/A             | 1991JP-0046431 | March 12, 1991 |

INT-CL (IPC): A23L001/305; A61K037/64 ; A61K038/55 ; A61P009/12 ;  
C07K014/46 ; C07K015/06 ; C12N009/99 ; C12P021/06

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04282400A

BASIC-ABSTRACT: Peptide contains peptide obtd. by trypsin-decomposing whey protein.

The peptide is pref. produced by decomposing whey protein with trypsin.

USE - Used for treating hypertension or as a material for health or functional foods.

In an example, cheese whey powders (100g) were dissolved in distilled water (1l). The soln. was subjected to dialysis with a dialysis tube (fractional mol.wt. 12000-14000) at 4deg.C on an aq. flow for two days to remove low mol.wt. substances e.g. riboflavin and lactose. Then, dialysis inner liquor was adjusted to pH 8.0 with 1N NaOH and Ca chloride was added to the liquor to give a final concn. of 5mM. The mixt. was kept at 37deg.C. Trypsin (Sigma Chemical Co's product, Type X IIII originated from bovine pancreas, TPCK treatment, 12200 BAE unit/mg protein) (100 mg) was added to the liquor, and the mixt. was stirred for 12 hours for decomposition, HCl was added to the decomposed liquor to adjust the pH to 3.0 to ppte. unchanged protein and trypsin. The ppte. was removed by centrifugal sepn. (8,000 r.p.m., 30 minutes). The residue was subjected to ultrafiltration (Advantec Toyo Co's product, trade name 'UHP-150', filter membrane: Fuji Filter Kogyo K.K.'s product, fractional mol. wt. 10000) to remove high mol.wt. substance. The obtd. concentrate was passed through reverse phase series of resin (trade name 'Cosmos IL C18-OPN' (Nakarai Tesk Co's product)) swollen with 0.01wt.% TFA soln.-packed column (dia. 3.5x50cm). The column was washed with 0.01% wt.% of TFA soln., and eluted with 0.1wt.% TFA-methanol straight line concn. slope. The flow rate was 3 ml/min., and concn. of the slope was 0.2%/min. Fractions of most strong ACE-inhibiting activity (10 minutes-50 minutes after the start of gradient) were collected, methanol was removed by concn. under reduced pressure and the residue was freeze-dried to give white powders (100 mg). The obtd. peptide was analysed by (HPLCE

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:  
NEW ACE INHIBIT PEPTIDE HYPERTENSIVE TREAT HEALTH FOOD CONTAIN PEPTIDE OBTAIN  
TRYPSIN DECOMPOSE WHEY PROTEIN

DERWENT-CLASS: B04 D13 D16

CPI-CODES: B04-C01; B12-F05A; B12-J01; D03-H01T; D05-C11;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M720 M903 N161 N511 P526 P616 Q211 Q220 V815

V901 V902

Registry Numbers

92407

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1992-173901

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-282400

(43) 公開日 平成4年(1992)10月7日

| (51) Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号  | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|-------|---------|-----|--------|
| C 0 7 K 15/06             |       | 7731-4H |     |        |
| A 2 3 L 1/305             |       | 8114-4B |     |        |
| // A 6 1 K 37/64          | A B U | 8314-4C |     |        |
| C 1 2 N 9/99              |       |         |     |        |
| C 1 2 P 21/06             |       | 8214-4B |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

|           |                 |          |   |
|-----------|-----------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願平3-46431      | (71) 出願人 | 000104353<br>カルビス食品工業株式会社<br>東京都渋谷区恵比寿西2丁目20番3号           |
| (22) 出願日  | 平成3年(1991)3月12日 | (72) 発明者 | 湯浅 洋二郎<br>東京都渋谷区恵比寿南2丁目4番1号 カ<br>ルビス食品工業株式会社研究開発センター<br>内 |
|           |                 | (72) 発明者 | 素本 明重<br>東京都渋谷区恵比寿南2丁目4番1号 カ<br>ルビス食品工業株式会社研究開発センター<br>内  |
|           |                 | (74) 代理人 | 弁理士 酒井 一 (外2名)  |

(54) 【発明の名称】 アンジオテンシン変換酵素阻害ペプチド

(57) 【要約】

【構成】 乳清タンパク質をトリプシン分解して得られるペプチドを有効成分とすることを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。

【効果】 前記ペプチドは、優れたACE阻害活性を有し、安全性にも優れているので、医薬、健康食品又は機能性食品等に使用することにより、高血圧の治療又は予防等に優れた効果が期待できる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳清タンパク質をトリプシン分解して得られるペプチドを有効成分とすることを特徴とするアンジオテンシン変換酵素阻害活性を有するペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アンジオテンシン変換酵素（以下ACEと称す）阻害活性を有し、高血圧の治療あるいは予防等に有用な新規なペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】 レニン-アンジオテンシン系が、高血圧や心不全などの循環器系疾患の病態に、重要な意義を有することは、多くの研究によって明らかにされている。このレニン-アンジオテンシン系には、ACEが存在し、この酵素が血圧の調節に関して深い関係を有している。すなわちACEは、活性前駆体であるオリゴペプチド・アンジオテンシンIのカルボキシル基末端からジペプチドを切り出し、血管収縮性を有するアンジオテンシンIIを生成する。また、降圧ペプチド又はブラジキニンを分解する作用も有しており、血圧上昇に作用する酵素である。従ってアンジオテンシンIIの生成を阻害する、すなわちACEの活性を阻害することによって、血圧上昇を抑制することができる。以上のことから天然物、合成物についてACE阻害物質の検索が行われ、カプトプリルをはじめとする種々の阻害剤の開発がなされている。

【0003】 さて、ACEは、上述のごとくジペプチドを切り出すアミノペプチダーゼであるので、ACEの結合部位に対する親和力を有するペプチドは、基本的にはACEの阻害物質になりうる。従来、タンパク質は、種々の消化酵素の働きでアミノ酸にまで分解され、単なる栄養分として吸収されると考えられてきたが、最近一部のタンパク質は小腸からオリゴペプチドとして吸収されるという報告もなされ、そのペプチドが生体にホルモン様作用を及ぼす可能性は高い。この様な背景のもと、食品由来の生理活性ペプチドの検索が各方面で行われている。すでに免疫賦活などの作用を有するペプチドが公知となっており、ACEを阻害するペプチドがカゼイン、大豆等の酵素分解物中に存在することが知られているが、経口投与によるACE阻害活性の有効性を示す具体的なペプチドについては知られていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、経口投与においても優れたACE阻害活性を有し、高血圧の治療又は予防に有用なペプチドを提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明によれば、乳清タンパク質をトリプシン分解して得られるペプチドを有効成分とすることを特徴とするACE阻害活性を有するペ

プチドが提供される。

【0006】 以下本発明を更に詳細に説明する。

【0007】 本発明のペプチドは、ACE阻害活性を有し、且つ乳清タンパク質をトリプシン分解して得られるペプチドを有効成分とする。

【0008】 本発明において有効成分として用いるペプチドは、乳清タンパク質を出発原料として、トリプシンにより分解して得られるものであって、好ましくは分子量1000以下程度のペプチドである。該出発原料として用いる乳清タンパク質としては、例えばチーズホエー、酸ホエー等を挙げることができる。また該乳清タンパク質を分解するトリプシンは、タンパク質分解酵素の一種であって、市販品を用いることができる。前記乳清タンパク質を分解する際のトリプシンの仕込み量は、好ましくは乳清タンパク質100重量部に対して、0.1～1重量部の範囲である。

【0009】 次に本発明のペプチドを製造方法により説明する。

【0010】 本発明のペプチドを製造するには、例えばpH6～9の条件下、好ましくは予め低分子物質を除去した乳清タンパク質とトリプシンとを、反応温度25～50℃において、8～24時間反応させ、乳清タンパク質の分解物を得、次いで、加熱処理及び／又は酸処理により、トリプシン及び未分解のタンパクを沈殿除去した後、ペプチドを精製する方法又は前記分解物にメタノール、エタノール等の有機溶媒を添加してペプチドを抽出した後、ペプチドを精製する方法等により得ることができる。この際得られるペプチドは、有機溶剤等を除去した後、水溶液とし、限外濾過等により分子量の大きなペプチドを除去してから精製するのが好ましい。該精製は、例えば商品名「COSMOSIL C18-OPN」（ナカライテスク社製）等の逆相系樹脂を充填したカラムに、前記得られた分解物を添加し、非吸着部分を良く洗浄した後、メタノール等の有機溶媒により溶出させ、ACE阻害活性を示す画分のみを収集する方法、高速液体クロマトグラフィーにより大量分取する方法又はゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の生化学的手段により精製する方法等によって行なうことができる。

【0011】 得られるペプチドは、液状又は粉末化処理等を行うことによって有効成分とすることができ、必要に応じて、塩酸塩、硫酸塩、コハク酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩等の製薬上許容される塩を付加することも可能である。

【0012】 本発明のペプチドは、そのまま又は健康食品或いは機能性食品として経口投与することができる。他、静脈注射投与等によって投与することができる。この際本発明であるペプチドの摂取量は、摂取する対象によって異なるが、例えば人の場合、有効成分であるペプチドの固形分換算で、通常1日当り100mg程度以上

摂取するのが好ましく、特に本発明のペプチドは天然物由来のものであって毒性の心配がないので、毎日常用することにより優れた効果を得ることができる。

#### 【0013】

【発明の効果】本発明のペプチドは、優れたACE阻害活性を有し、安全性にも優れているので、医薬、健康食品又は機能性食品等に使用することにより、高血圧の治療又は予防等に優れた効果が期待できる。

#### 【0014】

【実施例1】チーズホエーパウダー100gを蒸留水10リットルに溶解した後、透析チューブ（分画分子量12000～14000）を用いて、4℃流水中で透析を2日間行い、リボフラビン、乳糖等の低分子物質を除去した。次いで透析内液を1N水酸化ナトリウムによりpH8.0に調整した後、塩化カルシウムを終濃度5mMになるように添加し、37℃に保温して、トリプシン（シグマ化学社製のトリプシン、牛すい臓由来TypeXII I、TPCK処理、12200BAEE unit/mgプロテイン）100mgを加え、攪拌しながら12時間分解を行った。次に得られた分解液に塩酸を添加してpH3.0とし、未反応のタンパク質およびトリプシンを沈殿させた。遠心分離（8000rpm, 30分間）により沈殿物を除去した後、さらに限外濾過器（アドバンテック東洋社製、商品名「UHP-150」、濾過膜：フジフィルター工業社製、分画分子量10000）で高分子物質を除去した。得られた濃縮液を、0.01重量%TFA溶液で膨潤させた逆相系樹脂〔商品名「COSMOSIL C18-OPN」（ナカライテスク社製）〕を充填したカラム（φ3.5×50cm）に通し、0.01重量%TFA溶液で洗浄後、0.01重量%TFA-メタノールの直線濃度勾配で溶出を行なった。流速は3ml/分、濃度勾配は0.2%/分とした。最もアンジオテンシン変換酵素阻害活性の強い画分（グラジエント開始後、10分から50分まで）を収集し、減圧濃縮によりメタノールを除き、凍結乾燥により白色粉末100mgを得た。

【0015】得られたペプチドを、下記分析条件により高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。その結果を図1に示す。

#### 【0016】分析条件

カラム：R-ODS-5 4.6×250mm YMC社製

Aバッファー：0.01%TFA溶液、

Bバッファー：アセトニトリル

流速：1ml/min

図1に10分から60分までのBバッファーのリニアグラジエントパターンを示す。

#### 【0017】

【試験例1】実施例1で調製したペプチドを試験管に0.04ml入れた後、0.1Mホウ酸緩衝液（0.3M, NaClを含む、pH8.3）で終濃度を5mMに調整した酵素基質（ヒプリヒスチジルロイシン、シグマ化学社製）0.2mlを添加し37℃で10分間保温した。次いで、蒸留水を添加して25mU/mlに成るように調整したうさぎ肺のACE（シグマ化学社製）0.04mlを添加し、37℃、30分間反応させた。その後、1N塩酸0.25mlを添加し反応を終了した後、1.7mlの酢酸エチルを加え、20秒間激しく攪拌し、3000rpmで10分間遠心分離して、酢酸エチル層を1.4ml採取した。得られた酢酸エチル層を120℃で40分間加熱し溶媒を除去した後、蒸留水を1.0ml添加し、抽出したヒプリル酸の吸収（228nmの吸光度）を測定して、これを酵素活性とした。

【0018】次の式からペプチドの阻害活性IC<sub>50</sub> [ACEの活性を50%阻害するために必要な試料濃度（μg/ml）]を測定したところ、実施例1及び実施例2で調製したペプチドは、共にペプチドの阻害活性IC<sub>50</sub>が、40μg/mlであった。

$$\text{阻害率} = (A - B) / (A - C) \times 100\%$$

A：試料（ペプチド）を含まない場合の酵素活性（228nmの吸光度）

B：試料添加の場合の酵素活性（228nmの吸光度）

C：酵素および試料を添加しない場合の酵素活性（228nmの吸光度）

#### 【0019】

【試験例2】水及び飼料を自由に摂取させて飼育した12週令雄の自然発症高血圧ラット（SHR）（日本チャールズリバー社、1群5匹）に、試料（実施例1で調製したペプチドを生理食塩水に溶解したもの）を、該ラットへ胃ゾンデにより強制的に経口投与し、6時間後に血圧を測定した。試料の投与量は、ラットの体重1Kg当たり、125mg、500mg、1000mgとした。また血圧の測定には、非観血式血圧測定装置（商品名「PE-300」、NARCO BIO-SYSTEM社製）を用い、tail-cuff法により最高血圧を測定した。その結果を1群の平均値として表1に示す。

#### 【0020】

【表1】

| 投与量 (mg/kg) | 最高血圧±SE (mmHg) |
|-------------|----------------|
| 0           | 222.3±2.0      |
| 125         | 218.1±7.0      |
| 500         | 216.5±3.7      |
| 1000        | 201.6±3.5 *    |

\* 危険率0.1%で有意差あり

【0021】

【試験例3】12週齢雄のSHR（1群3匹）を水及び試料は自由摂取させ、馴化飼育した後、前日絶食させたSHRに、生理食塩水に溶解した実施例1で調製したペプチドを、胃ゾンデにより強制経口投与（1000mg/kg体重）した。対照群（1群6匹）には、生理食塩\*

\*水のみを与えた。次いで試験例2と同様に血圧測定を行った。この際血圧測定は、強制投与後2, 3, 5, 7時間後に行なった。その結果を1群の平均値で表2に示す。

【0022】

【表2】

| 最 高 血 圧 ± S E (mmHg) |           |           |
|----------------------|-----------|-----------|
|                      | 対 照 群     | 投 与 群     |
| 投与前                  | 211.8±3.5 |           |
| 2時間後                 | 214.4±2.9 | 198.0±7.2 |
| 3時間後                 | 212.1±2.3 | 195.8±8.0 |
| 5時間後                 | 212.9±3.6 | 187.8±6.8 |
| 7時間後                 | 211.2±3.6 | 181.1±2.7 |
| 24時間後                | 217.0±3.7 | 218.0±3.5 |

【0023】試験例2及び3の結果から、本発明のペプチドが、強制経口投与により血圧を低下させ得ることが判った。

【0024】

【試験例4】12週齢雄のSHR（1群6匹）を、試験例3と同様に馴化飼育した後、蒸留水に溶解させた試料 21.4mg/mlを給水瓶に入れ、自由に6日間摂取させた。1日の平均摂取量は、約360mg（体重1k

gあたり1000mgに相当）であった。また飼料は自由摂取させた。6日目以降は対照群（1群6匹）と同じ水を与え飼育した。血圧は1日1回、試験例1と同じ方法で測定した。その結果を1群の平均値として表3に示す。

【0025】

【表3】

| 最 高 血 圧 ± S E (mmHg) |             |             |         |
|----------------------|-------------|-------------|---------|
|                      | 投 与 群       | 対 照 群       | 差       |
| 投与0日目                | 232.6 ± 0.6 |             | 5.8     |
| 投与1日目                | 229.0 ± 6.8 | 223.2 ± 3.1 |         |
| 投与4日目                | 209.4 ± 2.5 | 224.9 ± 2.8 | -15.5 * |
| 投与5日目                | 209.6 ± 4.2 | 228.1 ± 2.0 | -18.5 * |
| 投与6日目                | 206.1 ± 2.5 | 223.2 ± 3.1 | -17.1 * |
| 投与終了1日目              | 215.0 ± 2.5 | 220.3 ± 5.2 | -5.3    |
| 投与終了2日目              | 214.9 ± 8.2 | 213.9 ± 1.5 | 1       |

\* 危険率1%で有意差あり

【0026】表3の結果より、本発明のペプチドは少量  
ずつ長期に摂取することによっても血圧を有意に降下さ  
せることが判った。また投与を中止すると徐々に血圧は  
上昇し、投与前の血圧にまで回復した。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における本発明の精製されたACE阻  
害ペプチドのHPLCによる分析結果を示すグラフであ  
る。

【図1】

